

Aus der I. Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses

Neukölln, Berlin-Neukölln

Direktor: Professor Dr. med. Klaus Höldack

**LYMPHOCYTENKREUZKULTUREN
- STIMULIERT DURCH PHYTOHAEMAGGLUTININ -
VON VINBLASTIN-BEHANDELTEN PATIENTEN MIT
NORMALPERSONEN**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Medizinischen Doktorwürde

an den Medizinischen Fachbereichen

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Peter Boppel
aus Altlandsberg

1972

Aus der I. Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses

Neukölln, Berlin-Neukölln

Direktor: Professor Dr. med. Klaus Holldack

**LYMPHOCYTENKREUZKULTUREN
- STIMULIERT DURCH PHYTOHAEMAGGLUTININ -
VON VINBLASTIN-BEHANDELTEN PATIENTEN MIT
NORMALPERSONEN**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Medizinischen Doktorwürde

an den Medizinischen Fachbereichen

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Peter Boppel

aus Altlandsberg

Referent: Professor Dr. med. Irene BOLL

Korreferent: Professor Dr. med. Horst BRÜCHER



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 10. 1. 1972

I N H A L T

I. EINLEITUNG	S. 1
1. Überblick über die Kenntnisse von der Einwirkung von Cytostatika einschließ- lich Vinblastin auf die Lymphocyten- transformation in vitro	1
2. Chemie und Wirkungsweise von Vincaleuko- blastin	4
II. FRAGESTELLUNG	6
III. METHODE	7
IV. ERGEBNISSE	15
1. Vorbemerkungen	15
2. Differentialzählung der Lymphocyten- kulturen	16
3. Signifikanzberechnungen	25
4. Mitosebefunde	30
5. Zusammenfassung der Ergebnisse	33
V. DISKUSSION	35
VI. ZUSAMMENFASSUNG	43
VII. LITERATUR	45

I. EINLEITUNG

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, in welcher Weise Vinblastin - in vivo gegeben - auf mit Phytohaemagglutinin stimulierte Lymphocytenkulturen in vitro einwirkt.

1. Überblick über die Kenntnisse von der Einwirkung von Cytostatika einschließlich Vinblastin auf die Lymphocytentransformation in vitro

Cyclophosphamid führt nach ASTALDI (3) sowohl nach Gabe in vivo als auch in vitro zu einem Rückgang der Transformationsrate.

Ähnliches berichtet HERSH (34), der - allerdings bei einer Kombinationstherapie - ein völliges Erlöschen der Immunoblasten-Bildung sieht. SCHEURLIN (54, 55) dagegen findet unter der Behandlung sowohl von Carcinom- als auch M. Hodgkin-Patienten keine signifikante Abnahme und unter ultrahohen Dosen von Cyclophosphamid sogar eine Zunahme der Blastenbildung.

Über L-Asparaginase berichten ASTALDI (5) und BISCATTI (10), daß sich nach einmaliger intravenöser Gabe von 200 bis 800 IU die Lymphocytenumwandlung maximal nach 2 - 4 Tagen vermindert. Die Ausgangswerte werden erst nach 10 - 14 Tagen wieder erreicht.

OHNO (46) sieht bei täglich therapeutisch gegebenen 20.000 - 50.000 IU eine Inhibition der Immunoblastenbildung. Wird L-Asparaginase in einer Menge von 0,5 - 5 IU/ml der Lymphocytenkultur in vitro hinzugesetzt, findet OHNO (47) ebenfalls eine Abnahme der Transformationsrate.

Zu ähnlichen Ergebnissen kommen KRUG (38) und KIRCHNER (36).

BISCATTI (10) untersucht in Lymphocytenkreuzkulturen nach L-Asparaginaseinjektion das unterschiedliche Verhalten von Plasma und Lymphocyten.

Bei diesen Kreuzkulturen werden Zellen von mit L-Asparaginase-Behandelten mit Plasma von Nicht-Behandelten gemischt und vice versa. Dabei zeigt sich, daß in diesen Kreuzkulturen nur dann eine deutlich verminderte Lymphocytentransformation auftritt, wenn die Kulturen mit L-Asparaginasehaltigem Serum angesetzt werden.

Über Chlorambucil berichtet BOURONCLE (13) von einer signifikanten Verminderung der Blastenbildung nach 7 Tagen bei 25 Patienten mit chronisch lymphatischer Leukaemie.

SCHEURLEN (55) und DENMAN (17) dagegen sehen keine signifikante Abnahme der Transformation durch diesen Stoff.

Aktinomycin D führt nach HIRSCHHORN (35) in vitro zu einer Hemmung der γ -Globulinproduktion der Immunoblasten. BERNENGO (9) und FARROW (20) sehen nach Zugabe dieses Stoffes in vitro eine Verminderung der DNA-Synthese, gemessen am Einbau des ^3H -Thymidins in die Immunoblasten.

SCHUBERT (56) findet bei an idiopathisch thrombopenischer Purpura erkrankten Patienten nach Behandlung mit Aktinomycin C eine Verminderung der γ -Globuline sowie in einem Fall ein Ausbleiben der Blastentransformation.

Cytosin-Arabinosid führt nach FARROW (20) in vitro zu einer Blastendepression, wiederum gemessen an dem ^3H -Thymidin-Einbau in die DNA-Synthese.

6-Mercaptopurin bewirkt nach HERSH (34) in einer Kombinationstherapie mit Methotrexat eine Inhibition der Blastenbildung.

HEINE (31) findet jedoch keine signifikante Abnahme der Blastentransformation bei 30 Patienten, die wegen nicht-maligner Erkrankung dieses Medikament erhalten hatten.

Nach GOLDSMITH (26) läßt sich in vitro durch niedrige Dosen von 6-Mercaptopurin in Kombination mit Phytohaemagglutinin eine Verstärkung der an sich geringeren γ -Globulin-Produktion der Lymphocyten von Patienten mit chronisch lymphatischer Leukaemie erreichen.

Bei mit Azothioprin behandelten Tumorkranken findet SCHEURLIN (55) eine Abnahme der Blastenbildung.

HEINE (31) sieht nach Behandlung mit diesem Immunosuppressivum wie auch DAU (16) bei Patienten mit multipler Sklerose und DENMAN (17) bei Patienten mit rheumatoider Arthritis keine Veränderungen der Blastentransformation gegenüber Kontrollgruppen.

In der schon erwähnten Arbeit von ASTALDI (3) ist 5-Fluouracil dasjenige Medikament, welches nach Gabe in vivo als auch in vitro den stärksten depressiven Effekt auf die Blastentransformation ausübt. HERSH (34) berichtet über ähnlich starke Wirkungen.

Daunomycin hat nach ASTALDI (3) in vivo wie in vitro einen mäßig inhibitorischen Effekt auf die Immunblastenbildung.

Mit Vinblastin (Vincal leukoblastin) führt ASTALDI (3) in vitro und in vivo Versuche durch und kommt zu folgenden Ergebnissen: Wird Vinblastin in einer Dosierung von 0,2 $\mu\text{g/ml}$ Lymphocytenkulturen in vitro zugegeben, kommt es zu einer signifikanten Depression der Blastenzahlen nach 48 und 72 Stunden.

In einer anderen Versuchsserie wird haematologisch gesunden Carcinom-Patienten eine einmalige Dosis von 20 mg Vinblastin intravenös gegeben, und 48 Stunden später werden mit Phytohaemagglutinin stimulierte Lymphocytenkulturen angelegt. ASTALDI beobachtet eine ausgesprochene Depression nach 24, 48 und 72 Stunden, wobei die Inhibition der Blastenbildung bei dem in vivo Experiment ausgeprägter ist.

HAN (29) findet bei 8 Patienten mit M. Hodgkin, die mit Vinblastin behandelt worden waren, zwar eine Depression der Blastenbildung im Vergleich zu Kontrollen, eine statistische Signifikanz jedoch läßt sich nicht erweisen.

Zu anderen Ergebnissen kommt SCHEURLIN (53), der von 10 cytostatisch behandelten M. Hodgkin-Patienten berichtet, von denen 5 Vinblastin bekamen. Bei diesen 5 Patienten blieb die Transformationsrate in einem Falle gleich, zwei verbesserten sie und bei zweien nahm sie ab.

2. Chemie und Wirkungsweise von Vincaleukoblastin

Vincaleukoblastin (VLB) ist das Hauptalkaloid aus *Vinca rosea* L., einer immergrünen Apozynazee.

Chemisch handelt es sich bei VLB um ein Indol-Dihydroindol-Derivat mit der Summenformel $C_{46}H_{58}O_9N_4$ (aus SIEBS (57)).

Im Tierversuch verursacht VLB eine Hemmung der Leukopoese (CUTTS (15)).

Das Alkaloid wird in der Humanmedizin als Cytostatikum bei der Behandlung von malignen Erkrankungen des lymphoretikulären Systems angewendet.

Über die Wirkungsweise des VLB und auch des Vincristins, eines anderen Alkaloids derselben Pflanze, ist folgendes bekannt:

Nach Untersuchungen von VAITKEVICIUS (61) kommt es zu einer deutlichen Zunahme der Metaphasen im untersuchten Gewebe. Der Mitoseablauf ist in der Metaphase blockiert, wodurch ein Verschwinden bzw. eine Verminderung post-metaphasischer Stadien zu beobachten ist, während die Prophase ungestört abläuft. Dies sind dem Colchicin vergleichbare Wirkungen.

Als biochemische Ursachen werden nach FUSENING (22) diskutiert:

1. Störung der Nucleinsäuresynthese,
2. Störung des Spindelaufbaues durch Verminderung der intrazellulären Aminosäurekonzentration und
3. eventuell eine direkte Wirkung des VLB auf die Verknüpfung der praeformierten Spindeleinheiten.

Nach GEORGE (25) ist die Zellmembran nur in der Metaphase für Vincristin permeabel. Nach GEBHARDT (24) und FUSENING (22) üben die Vincaalkaloide ihren cytostatischen Effekt ausschließlich in der Metaphase aus. Darüberhinaus muß aber insbesondere nach den Arbeiten von VAITKEVICIUS (61), SVOBODA (58), KRAHE (37) und MALAWISTA (42) noch an andere Einwirkungsmöglichkeiten gedacht werden.

II. FRAGESTELLUNG

Um die Einwirkung des VLB auf die Lymphocytenanttransformation in vitro zu untersuchen, stellen wir uns folgende Fragen:

1. Ändert sich im Vergleich zu Kontrollkulturen (Patienten vor der VLB-Behandlung bzw. Normalpersonen) die Blasten-Transformierungsrate?
Ist eine zeitliche Beziehung zur Applikation des Medikamentes herstellbar?
Wie unterscheidet sich das Patientenkollektiv der VLB-Behandelten vor der Behandlung vom Normalkollektiv?
2. Reagieren die Lymphocyten der mit VLB-Behandelten im Plasma der Normalpersonen stärker auf die Stimulierung mit Phytohaemagglutinin?
3. Reagieren die Lymphocyten von Nicht-Behandelten im Plasma der VLB-Behandelten schwächer auf die Stimulierung?
4. Wird ein gehäuftes Auftreten von Metaphasen beobachtet?
5. Stimmen unsere Ergebnisse mit dem bisher Bekannten überein, und lassen sich Beziehungen zum Wirkungsmechanismus von Vincaalkaloiden herstellen?

III. M E T H O D E

Die Lymphocytenkulturen wurden in folgender Weise hergestellt:

Den Patienten bzw. Normalpersonen wurde mit einer Heparin- (Liquemin-Originallösung) angefeuchteten 20-ml-Spritze unter sterilen Kautelen aus der Vena cubiti Blut entnommen. Dabei wurde der Zeitpunkt so gewählt, daß die Blutabnahme das eine Mal vor der Velbe^R-Behandlung⁺ (7 Versuche), das andere Mal einen Tag (7 Versuche), eine Woche (6 Versuche) bzw. zwei Wochen (8 Versuche) nach letzter Velbe^R-Injektion erfolgte. Die Dosierungen des Medikamentes lagen zwischen 0,07 und 0,2 mg/kg Körpergewicht. Das Blut wurde in einem sterilen 50-ml-Röhrchen für einige Stunden bei 37° C aufbewahrt. Das dann überstehende Plasma wurde abpipettiert und auf 2.000 - 3.000 Leukocyten/ μ l Kulturmedium eingestellt. Das leukocytenhaltige Plasma wurde in einer entsprechenden Menge Eagle Medium auf 7 - 10 ml aufgefüllt, mit 2 - 4 Tropfen Phytohaemagglutinin P der Fa. Difco sowie mit 5 Tropfen einer 0,9%-Kochsalz-Lösung versetzt, die auf 100 ml 20 mg Streptomycin und 100 mg Ampicillin enthielt. Um eine möglichst große Gasphase über der Flüssigkeitskultur zu erhalten, wurde dieser Kulturansatz in 25-ml-Kölbchen gegeben und mit Gummistopfen verschlossen.

Die Kreuzkulturen wurden in folgender Weise hergestellt: Nach dem Sedimentieren von 20 ml Vollblut (2 - 3 Stunden bei 37° C) wurde das Überstehende, zellhaltige Heparinplasma soweit möglich völlig vom Erythrocytensediment abpipettiert.

Nach Leukocytenzählungen wurde dieses zellhaltige Plasma bei 60 g 10 Minuten zentrifugiert. Das so erhaltene zell-

⁺ Velbe^R, ein VLB-Präparat der Eli Lilly GmbH, USA

freie Plasma wurde vom Zellsediment (höchstens 1/2 ml) durch Pipettieren getrennt. Dann wurde dieses Sediment z.B. eines mit Velbe^R behandelten Patienten mit der Menge Plasma der Kontrollperson aufgeschwemmt, die auch für die Eigenkultur der Kontrollperson benutzt wurde. In gleicher Weise wurden Zellen der Kontrollperson mit Plasma des Patienten gemischt.

Zur Einstellung der Zellzahl auf 2.000 - 3.000/ μ l wurde auch hier mit Eagle Medium aufgefüllt. Die Weiterverarbeitung der Kultur erfolgte dann, wie oben angegeben.

Am 3., 5. und 7. Tag wurden der Kultur Proben entnommen, bei 60 g 10 Minuten zentrifugiert und vom Zellsediment Ausstriche mit Färbung nach PAPPENHEIM angefertigt. Ein ebensolcher Ausstrich wurde nach Zentrifugation vom Original-Leukocytenansatz hergestellt.

Somit gelangten folgende Kulturarten zur Auswertung:
Zellen der VLB-Behandelten in homologem Plasma ($Z_V^{P_V}$),
Zellen der Kontrollpersonen in homologem Plasma ($Z_K^{P_K}$),
Zellen von VLB-Behandelten in heterologem Plasma ($Z_V^{P_K}$),
Zellen der Kontrollpersonen in heterologem Plasma ($Z_K^{P_V}$)
sowie Zellen der Patienten vor der VLB-Behandlung in homologem Plasma ($Z_O^{P_O}$).

Vom Originalausstrich sowie von den am 3., 5. und 7. Kulturtag angefertigten vier Ausstrichen wurden vom jeweils besten 200 Zellen differenziert.

Ausgezählt wurden vorwiegend die aufgelockerten Randpartien, indem diese Gebiete mäanderförmig durch das Gesichtsfeld geschoben wurden. Jedes Gesichtsfeld, das zu differenzierende Zellen bot, wurde ganz ausgezählt und differenziert.

Insgesamt wurden 21 Kreuzkulturen und 7 einfache Kulturen angelegt, somit 1.456 Ausstriche angefertigt und

72.800 Zellen gezählt und differenziert.

In der Tabelle 1 auf Seite 10 wurden die wichtigsten Daten des mit Velbe^R behandelten Patientenkollektivs zusammengestellt.

NAME	ALTER	DIAGNOSE	BLUTBILD W. b. UNTERS. W. b. UNTERS. ENDE	ERY MILL/ μl	Hb g %	LEUKO 10 ³ / μl	BAS % EOS % LGL % STB % SEG % LYM %	MONO %	BSG	BEHANDLG. VOR VLB	VLB mg EINZELDOSEN	VLB JUNIO ANZ.	VLB GE- SAMT mg	VLB mg/kg KG
1) E.M.	12	HODGKIN	a: 4,4 b: 5,2	4,4 5,2	12,8 14,6	3600 7100	/ 7 / 6	/ 1 / 1	59 47	23 36	11/29 15/30	26	111,3	0,10
2) G.U.	44	HODGKIN	a: 3,31 b: 4,1	3,31 4,1	8,9 12,2	19000 23300	/ 3 / 1	5 85 13 78	7 8	129/40 110/37	11 X 10	11	110	0,18
3) M.F.	51	LYMPHO-SA	a: 3,96 b: 4,61	3,96 4,61	13,5 15,5	6800 4700	/ 3 / 4	1 23 5 40	70 48	17/25 17/32	5 X 10 / 5 X 7,5 1 X 12,5 / 1 X 15	12	105	0,12
4) S.F.	77	LYMPHO-SA	a: 3,9 b: 2,9	3,9 2,9	12,0 9,6	3500 4300	/ 2 / 1	6 64 10 66	28 15	30/60 15/55	6 X 10 PÖNTGEN HOCHV. ENDOXYAN, SANA- MYCIN	6	60	0,15
5) G.A.	72	RETICUL SA	a: 3,28 b: 2,9	3,28 2,9	10,3 9,3	6500 3900	/ 1 / 4	7 47 / 69	36 26	30/60 15/20	5 X 10 ENDOXYAN NATULAN	5	50	0,20
6) ST.R.	37	HODGKIN	a: 3,65 b: 3,8	3,65 3,8	11,6 12,2	13000 3400	/ 1 / 2	6 82 12 66	4 8	54/90 23/46	4 X 10 ENDOXYAN HOCHVOLT	4	40	0,15
7) K.M.	68	LYMPHO-SA	a: 3,9 b: 3,6	3,9 3,6	11,8 11,5	6900 5400	/ 1 / 2	/ 82 / 76	16 17	51/73 38/71	2 X 6,2 / 1 X 4,0 2 X 3,5	5	23,4	0,07

TABELLE 11 DATEN DES MIT VLB BEHANDELTEN PATIENTENKOLLEKTIVS

Von den Personen, die als Normalgruppe dienten, wurde ein vollständiges Blutbild angefertigt. Es handelte sich um 5 gesunde Kollegen unserer Klinik sowie um 15 haematologisch gesunde Patienten mit den folgenden Diagnosen:

- 1 mal Nephroptose
- 2 mal Ulcus ventriculi bzw. duodeni
- 1 mal Involutionsdepression, Hypertonus
- 3 mal Hypertonus
- 2 mal Vitium cordis
- 3 mal Coronarinfarkt
- 1 mal Pankreatitis
- 1 mal Arthritis
- 1 mal Colitis.

Es wurden folgende Zellen unterschieden:

- 1) neutrophile Segmentkernige
- 2) basophile Segmentkernige
- 3) eosinophile Segmentkernige
- 4) Lymphocyten
- 5) stimulierte Lymphocyten
- 6) Immunoblasten (Transformierte oder Phytozellen)
- 7) retikuläre Zellen.

Als Unterscheidungsmerkmale galten die nachstehenden Kriterien:

- 1) Der neutrophile segmentkernige Granulocyt (10 - 15 μ Durchmesser) besitzt einen in meist 3 - 4 Segmenten unterteilten Kern. Die Kernsegmente sind dicht, pyknotisch und durch fadenförmige, oft überlagerte Kernbrücken miteinander verbunden, die Granula sind fein und von bräunlich-violetter Färbung, das Plasma ist oxyphil.

- 2) Der basophile Segmentkernige ist ähnlich dem unter 1), unterscheidet sich durch über die ganze Zelle verteilte basophile Granula sowie den meist nur zweisegmentierten Kern.
- 3) Auch der eosinophile Segmentkernige hat meist nur zwei bis drei Segmente und unterscheidet sich von 1) und 2) durch seine eosinophilen Granula.
- 4) Der Lymphocyt von einem 9 - 12 μ großen Durchmesser besitzt einen runden, ovalen oder auch eingebuchteten dunklen Kern meist ohne sichtbare Nucleoli. Um den Kern befindet sich ein sehr schmaler Saum von blaßblauem, nicht oder selten azurophil granuliertem Cytoplasma. Der Kern ist grobschollig marmoriert und dicht.
- 5) Unter stimulierten Lymphocyten (transitional cells) werden Zellen verstanden, die im Unterschied zu 4) etwas mehr basophiles Cytoplasma ohne Vacuolen aufweisen. Die Zellbegrenzung ist regelmäßig, die Zellen sind insgesamt deutlich größer und die Kerne zeigen eine beginnende lockere Strukturierung mit eventuell gering sichtbaren Nucleoli.
- 6) Die eigentlichen Immunoblasten, auch Phytozellen, Blasten oder Transformierte genannt, sind große, den Germinoblasten oder den basophilen Stammzellen des Lymphknotens ähnliche Zellen mit kräftig blauem, häufig Vacuolen besitzendem Cytoplasma. Die Zellbegrenzung ist unregelmäßig. Die Kerne sind groß mit feiner Chromatinstruktur und enthalten einen oder mehrere deutliche Kernkörperchen.
- 7) Unter retikulären Zellen werden solche eingeordnet, die eine deutlich netzförmige Kernstruktur aufweisen. Die Kerne sind noch größer als unter 6), oft oval mit deutlichen, dunkelblauen Nucleoli. Die Zellstruktur ist unregelmäßig. Das reichliche, meist unscharf begrenzte Cytoplasma mit vielen Vacuolen ist von blaßblauer Farbe.

Nach BOLL (12) wurden folgende Mitosephasen unterschieden:

Die Prophase ist gekennzeichnet durch eine aufgelöste Kernmembran und die Auflockerung der Kernsubstanz. Es besteht noch ein festes Spirem, Nucleolen sind nicht vorhanden.

In der frühen Metaphase liegen die Chromosomen verteilt über die früheren Kerngrenzen hinaus (lockeres Spirem).

Die späte Metaphase kennzeichnet sich durch die Chromosomenanordnung zur Äquatorialplatte (Monaster).

In der Anaphase bilden die zu den Spindelpolen auseinanderweichenden Chromosomen einen Diaster. Die Zelle ist meist oval.

Während der Telophase haben sich zwei getrennte Chromosomenknäule gebildet (Dispirem). Das Protoplasma zeigt eine deutliche Einschnürung.

In der Rekonstruktionsphase sind die beiden Tochterzellen völlig getrennt oder auch noch durch eine feine Plasmabrücke verbunden. Die Kerne haben noch keine Kernmembran oder Nucleoli ausgebildet.

Die statistische Auswertung des Versuchsmaterials erfolgte nach dem χ^2 -Verfahren.

Die Formel zur Berechnung von χ^2 lautet nach PEARSON

(51):
$$\chi^2_{mf} = \sum \frac{(B-E)^2}{E}$$

Dabei bedeutet "B" die beobachtete Anzahl von Blasten in jeder einzelnen Klasse, "E" den Erwartungswert für jede Klasse und "mf" die Anzahl der Freiheitsgrade (= Anzahl der Klassen minus 1 x Anzahl der Gruppen minus 1).

Für jedes χ^2 läßt sich eine dazugehörige Wahrscheinlichkeit P errechnen. Diese Werte sind tabelliert worden. In der Praxis entnimmt man für einen χ^2 -Wert das dazugehörige P aus graphischen Tafeln. Wir benutzten die Darstellungen aus der Arbeit von BELITZ (8).

Bei unseren Berechnungen soll eine nicht zufallsbedingte Abweichung dann angenommen werden, wenn P kleiner als 0,01 ist.

IV. E R G E B N I S S E

1. Vorbemerkungen

A) Bei der Differenzierung der Kulturen zeigte sich, daß bereits am 3. Kulturtag die Granulocyten so weit degeneriert waren, daß sie statistisch nicht mehr erfaßbar waren (siehe auch Angaben bei AMBS (1), ASTALDI (2) und YOFFEY (64)).

Ein spontanes Auftreten von Immunoblasten konnten wir in unseren Originalausstrichen, das heißt ohne Phytohaemagglutinin-Stimulierung, nicht nachweisen.

Schwierigkeiten der Einordnung ergaben sich bei der Abgrenzung der stimulierten Lymphocyten zu den eigentlichen Immunoblasten sowie von diesen zu den retikulären Zellen. Um genauere Daten zugrunde legen zu können, entschieden wir uns, wie auch SCHEURLIN (54), zur endgültigen Einteilung in zwei Gruppen:

- 1) "Lymphocyten": beinhalten die oben gekennzeichneten Lymphocyten und die stimulierten Lymphocyten,
- 2) "Blasten": umfassen die oben beschriebenen Immunoblasten und retikulären Zellen.
Letztere stellen in dieser Entwicklungsreihe die Fortsetzungsstufe nach den Blasten dar (ASTALDI (2)).

B) Um die Frage nach der Wirkung von VLB auf die Umwandlung von Lymphocyten in Blasten beantworten zu können, wurden Kurven dargestellt, in denen die Kultivierungszeit in Tagen auf die Abszisse und die Blastenzahl in Prozent auf die Ordinate aufgetragen wurden.

Wir wählten zwei Darstellungsarten. Der jeweils erste Kurventyp veranschaulicht den Verlauf der Durchschnittswerte allein (die Durchschnittswerte ergeben sich aus den arithmetischen Mittelwerten). Die jeweils zweite Darstellungsart in Blockform gibt die einzelnen Blasten-Prozentzahlen (+) mit eingetragenen Durchschnittswerten (————) wieder.

Folgende Abkürzungen bedeuten:

$Z_V^{P_V}$: Zellen von mit Velbe^R behandelten Patienten in homologem Plasma (— — —)

$Z_K^{P_K}$: Zellen von Normalpersonen in homologem Plasma (————)

$Z_V^{P_K}$: Zellen von mit Velbe^R Behandelten in heterologem Plasma (— · — · —)

$Z_K^{P_V}$: Zellen von Kontrollpersonen in heterologem Plasma (— · — · —)

$Z_O^{P_O}$: Zellen der Patienten vor der Velbe^R-Behandlung in homologem Plasma (-----).

2. Differentialzählung der Lymphocytenkulturen

Die Abbildung I a gibt die Blasten-Durchschnittsprozente einen Tag nach VLB-Injektion wieder (s. Seite 17).

Sie zeigt am 3. und 5. Kulturtag bei den 7 Patienten mit lymphoretikulären Systemerkrankungen ($Z_O^{P_O}$) eine deutliche Depression der Blastenbildung, die einen Tag nach Velbe^R-Injektion noch verstärkt wird ($Z_V^{P_V}$).

Dagegen haben alle Zellen im Normalserum ($Z_K^{P_K}$ und $Z_V^{P_K}$) am 3. und 5. Kulturtag höhere Werte mit einem Maximum am 5. Tag.

Die Mischkulturen aus Normalzellen und Patientenplasma ($Z_K P_V$) zeigen am 3. und 5. Tag im Vergleich zu den Kulturen mit Normalseren niedrigere Werte, die auch noch unter denen vor VLB-Therapie liegen ($Z_O P_O$).

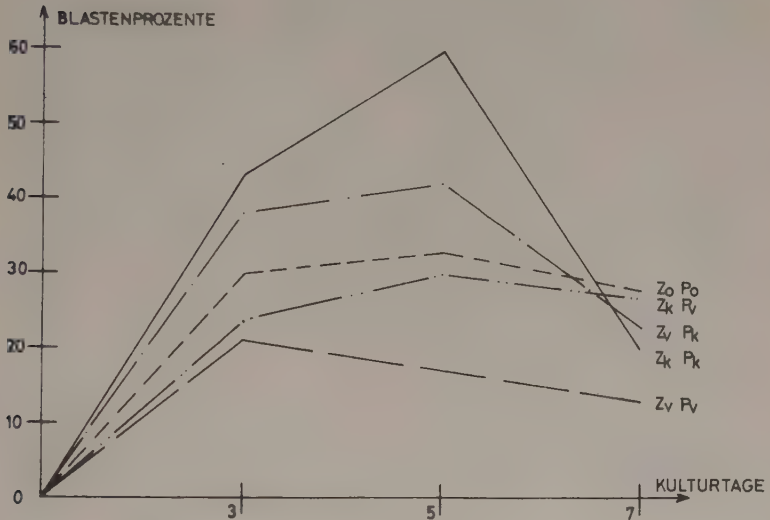
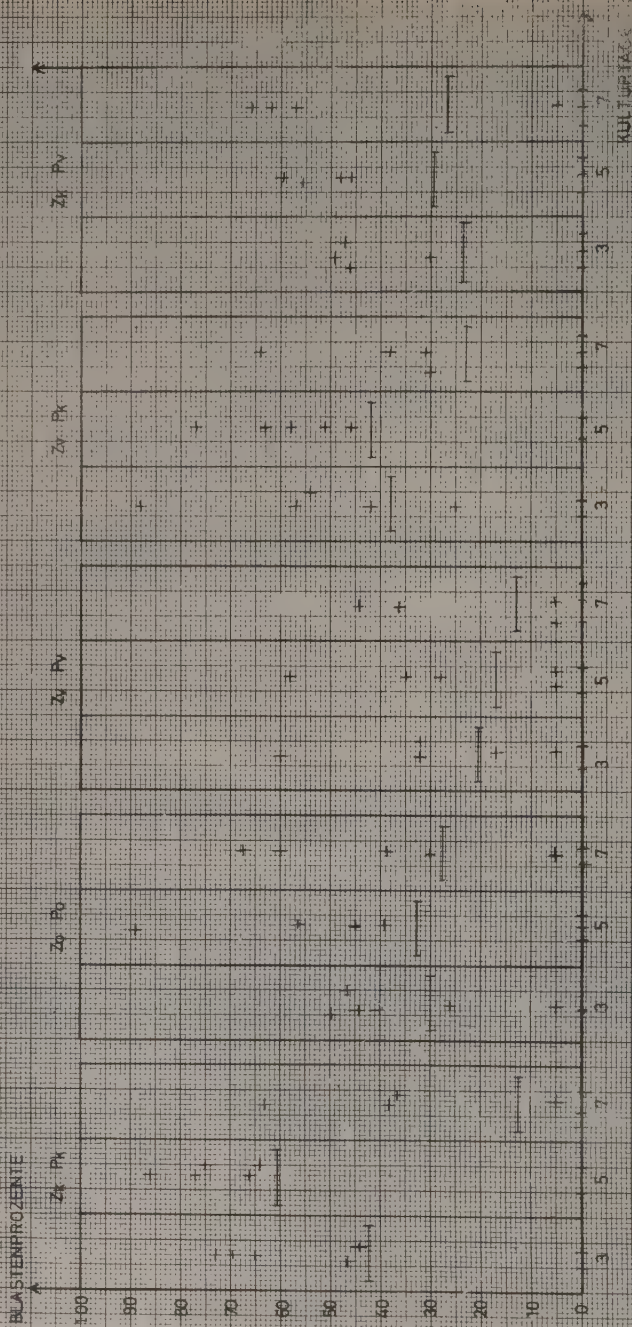


Abbildung I a

Mittelwertskurven der Blasten-Prozente 1 Tag nach VLB-Injektion

(Zeichen und Abkürzungen s. Seite 16)

Die Abbildung I b auf der folgenden Seite enthält die Durchschnittswerte (---), die sich aus den Blasten-Prozenten (+) ergeben und die den Kurvenpunkten der Abbildung I a zugrunde liegen.



ABILDUNG 1b) BLASTENPROZENTE 1 TAG POST INJEKTIONEN

• BLASTENPROZENTE
— DURCHSCHNITTSWERTE

Werden die Kulturen eine Woche nach einer VLB-Injektion angesetzt - Abb. II a und b (Seite 20) -, so wird ein Ansteigen der Patienten-Mittelwertskurve $Z_V^{P_V}$ deutlich, dies noch weit über die Werte von $Z_O^{P_O}$ (Patienten vor der Behandlung).

Deutlich jedoch bleiben die Blasten-Prozentzahlen des Patientenkollektivs unter VLB-Einfluß ($Z_V^{P_V}$) unter denen des Normalkollektivs ($Z_K^{P_K}$), welches auch 1 Woche p.i. die höchste Umwandlungsrate überhaupt erreicht. Sowohl die Normalkulturen ($Z_K^{P_K}$) als auch die Patientenkulturen ($Z_V^{P_V}$) zeigen eine stärkere Transformation der Lymphocyten als die Kreuzkulturen ($Z_K^{P_V}$ und $Z_V^{P_K}$). Letztere zeigen untereinander nur mäßige Unterschiede und haben bis auf den 5. Kulturtag bei den heterologen Normalkulturen ($Z_K^{P_V}$) höhere Blasten-Prozente als die Patienten vor VLB-Therapie ($Z_O^{P_O}$).

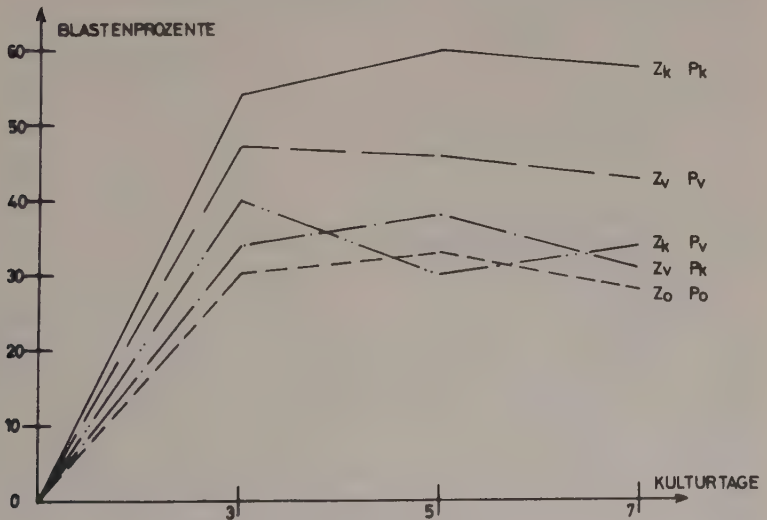


Abbildung II a
Mittelwertskurven der Blasten-Prozente 1 Woche nach VLB-Injektion
(Zeichen und Abkürzungen s. Seite 16)

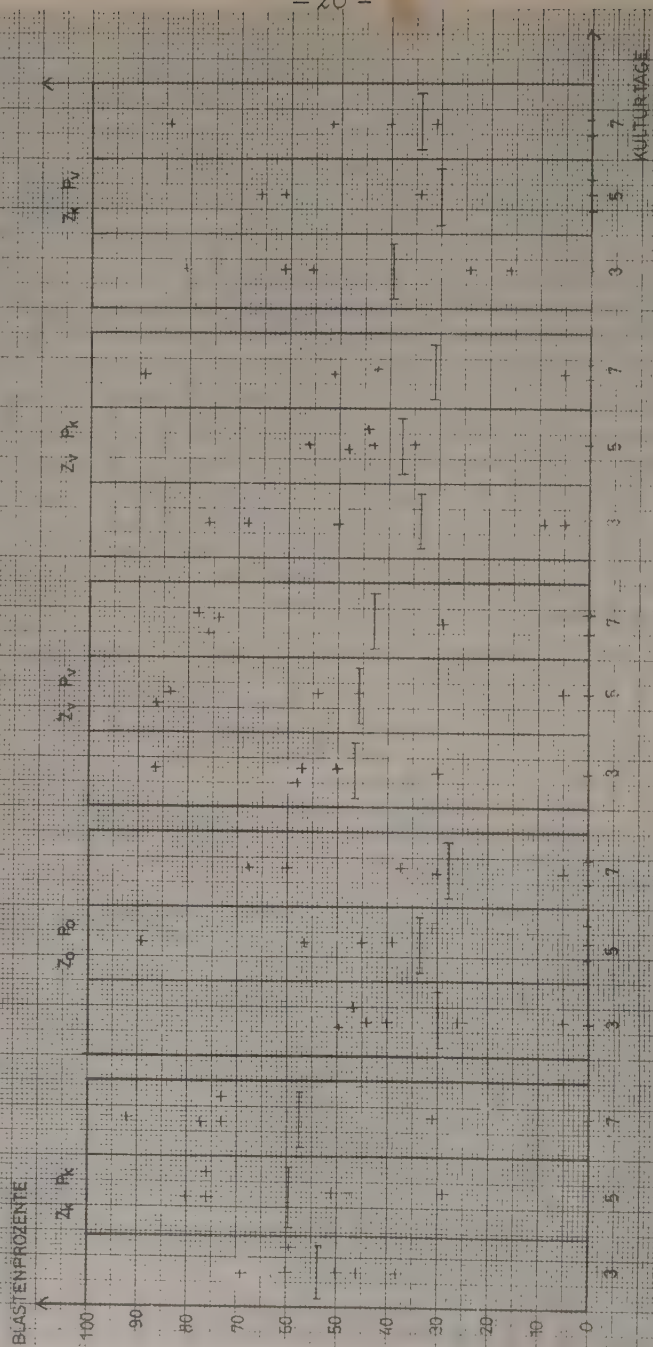


ABBILDUNG 116: BLASTENPROZENTE 1 WOCHE POST INJEKTIONEN

• BLASTENPROZENTE
— DURCHSCHNITTSWERTE

In den Abbildungen III a und III b (Seite 22) sind die Verhältnisse 2 Wochen nach letzter VLB-Injektion dargestellt.

Die Normalkulturen ($Z_K^{P_K}$) erreichen am 3. und 5. Kulturtag abermals die höchsten Blastenwerte.

Die Patientenversuche ($Z_V^{P_V}$) zeigen auch zu diesem Zeitpunkt höhere Blasten-Prozentzahlen als das Kollektiv $Z_O^{P_O}$ vor der Behandlung mit VLB.

Die Kurve der Mischkulturen aus Patientenzellen und Normalplasma ($Z_V^{P_K}$) zeigt höhere Durchschnittswerte am 3. und 5. Tag als die Patientenkurve ($Z_V^{P_V}$).

Die Kreuzkulturen aus Normalzellen und Patientenplasma ($Z_K^{P_V}$) übertreffen - bis auf die homologen Normalkulturen ($Z_K^{P_K}$) - am 3. Tag alle anderen Blastenwerte. Im weiteren Verlauf aber nimmt die Blastenzahl von $Z_K^{P_V}$ stark ab und erreicht am 7. Kulturtag die niedrigsten Werte überhaupt.

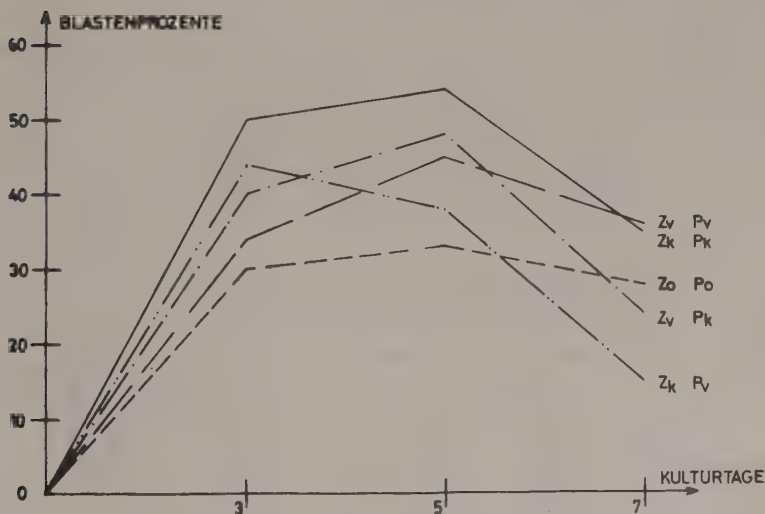
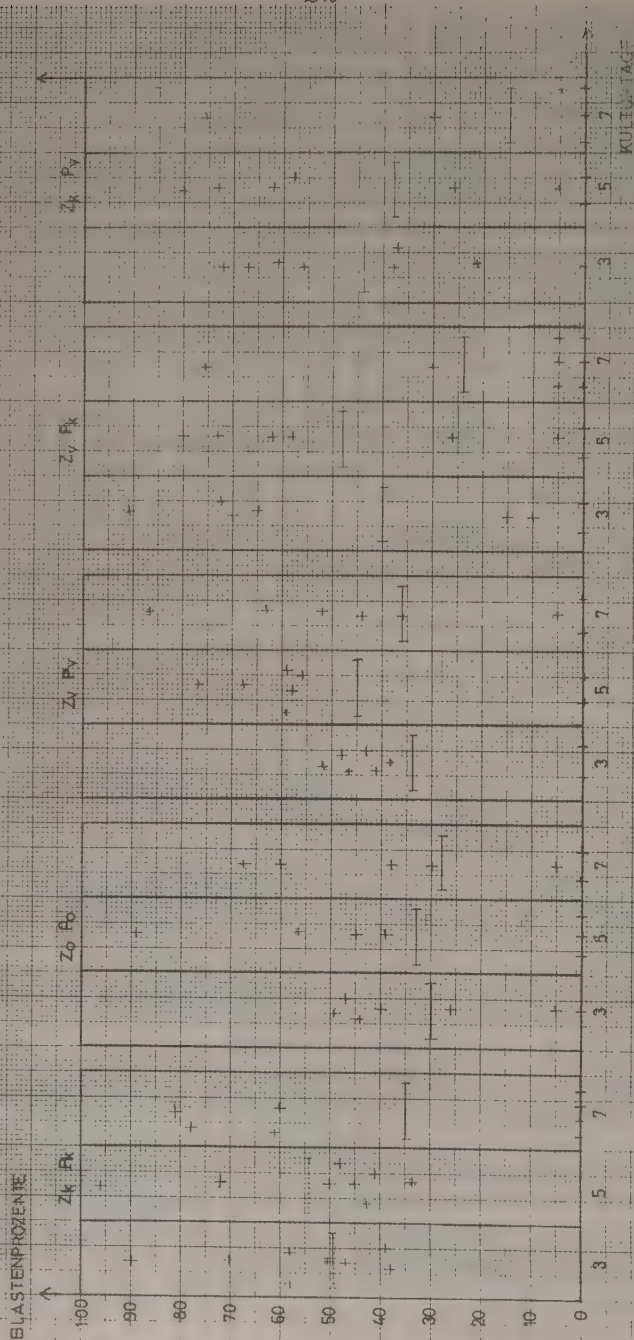


Abbildung III a

Mittelwertskurven der Blasten-Prozente 2 Wochen nach VLB-Injektion

(Zeichen und Abkürzungen s. Seite 16)



BLASTENPROZENTE 2 WOCHEN POST INJEKTIONEM

+ BLASTENPROZENTE
— DURCHSCHNITTSWERTE

ABBILDUNG III b

In Abbildung IV auf der folgenden Seite haben wir die Patientenkurven $Z_{V_V}^P$ und $Z_{O_O}^P$ sowie eine Mittelwertskurve $\overline{Z_{K_K}^P}$ aufgetragen, die sich aus den Kurven der Normalpersonen ($Z_{K_K}^P$) aus Abbildung I a, II a und III a errechnen läßt.

Man ersieht in der Durchschnittskurve I sehr eindrucksvoll die Blastendepression einen Tag nach der letzten VLB-Injektion.

Die höchsten Blastenzahlen werden von dem Patientenkollektiv eine Woche post injectionem erreicht, wie die Kurve II verdeutlicht.

Die Blasten-Prozente zwei Wochen nach der letzten Velbe^R-Injektion - Kurve III - zeigen im Vergleich zu II bedeutsame Unterschiede am 3. und 7. Kulturtag, während am 5. Tag keine so wesentliche Differenz in Erscheinung tritt.

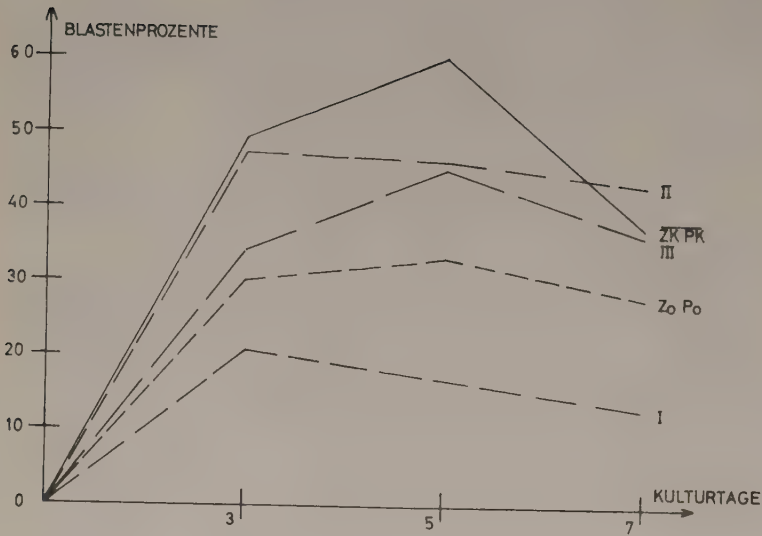


Abbildung IV

Vergleich der homologen Patientenkurven mit der Durchschnitts-
kurve der Normalpersonen

Es bedeuten:

- I : Patientenkurve Z_{VPV} 1 Tag nach VLB-Injektion aus Abb. Ia
- II : Patientenkurve Z_{VPV} 1 Woche nach VLB-Injektion aus Abb. IIa
- III : Patientenkurve Z_{VPV} 2 Wochen nach VLB-Injektion aus Abb. IIIa
- Z_{PO} : Patientenkurve vor VLB-Behandlung
- $\overline{Z_{KPK}}$: Durchschnittskurve der Z_{KPK} -Kurven aus Ia, IIa, IIIa
(weitere Zeichen und Abkürzungen s. Seite 16)

3. Signifikanzberechnungen

Wie aus den Abbildungen Ia, IIa, IIIa und IV zu entnehmen ist, zeigen fast alle Kurven zum 7. Tag hin einen Abfall. Da dieses Phänomen möglicherweise auf technische Fehler in den Kulturen zurückzuführen ist, verzichten wir auf eine statistische Bearbeitung der Werte am 7. Tag.

Die statistische Berechnung des Materials vom 3. und 5. Tag gibt uns darüber Aufschluß, ob sich die Verteilung der oben beschriebenen Gruppen signifikant voneinander unterscheidet.

Prinzipiell stellt sich der Versuchsplan folgendermaßen dar:

		$Z_{V^P V}$	$Z_{K^P K}$	$Z_{V^P K}$	$Z_{K^P V}$	$Z_{O^P O}$
I	3. Tag	292	596	532	334	
	5. Tag	242	846	590	418	
	7. Tag	181	295	326	380	422
II	3. Tag	563	645	406	474	
	5. Tag	550	719	452	362	459
	7. Tag	514	692	375	413	390
III	3. Tag	540	799	645	704	
	5. Tag	714	856	767	608	
	7. Tag	537	559	390	241	

Tabelle 2

Ergebnisse der Blastenzählungen

Es bedeuten:

- I = gezählte Blasten auf 1.400 Zellen 1 Tag nach VLB-Injektion jeweils vom 3., 5. und 7. Kulturtag
- II = gezählte Blasten auf 1.200 Zellen 1 Woche nach VLB-Injektion jeweils am 3., 5. und 7. Kulturtag
- III = gezählte Blasten auf 1.600 Zellen 2 Wochen nach VLB-Injektion jeweils am 3., 5. und 7. Kulturtag
(weitere Abkürzungen s. Seite 16)

Da sich die Art der Rechnung im folgenden nach der Formel $\chi^2_{m,f} = \sum \frac{(B-E)^2}{E}$ stets wiederholt (siehe auch Seite 14), wird nur die erste Berechnung ausführlich dargelegt.

Frage I: Bestehen zwischen den Patientenkulturen $Z_{V^P_V}$ und den Kontrollkulturen $Z_{K^P_K}$ einen Tag post injectionem signifikante Unterschiede am 3. Kulturtag?

$Z_{V^P_V}$ vom 3. Tag: gezählte Zellen = 1.400 = Nv
davon Blasten = 292 = Bv

$Z_{K^P_K}$ vom 3. Tag: gezählte Zellen = 1.400 = Nk
davon Blasten = 596 = Bk

Die Erwartungswerte E für Patienten (Ev) bzw. Kontrollen (Ek) berechnen sich wie folgt:

$$Ev = \frac{Nv \times (Bv+Bk)}{Nk + Nv}$$

$$Ek = \frac{Nk \times (Bk+Bv)}{Nk + Nv}$$

Der Erwartungswert beträgt in beiden Fällen bei gleichem N:

$$E = \frac{1.400 \times (296 + 596)}{2.800} = 444$$

Die Anzahl der Freiheitsgrade (mf) errechnet sich aus Anzahl der Klassen minus 1 multipliziert mit der Anzahl der Gruppen minus 1: $mf = (7 - 1) \times (2 - 1) = 6$

	B	E	B-E	(B-E) ²	(B-E) ² /E
Patienten	292	444	152	23.104	52,036
	1108	956	152	23.104	24,167
Kontrollen	596	444	152	23.104	52,036
	804	956	152	23.104	24,167
					= 152,406
					P < 0,01

Das Ergebnis bedeutet, daß am 3. Tag sich das Patienten- vom Kontrollkollektiv signifikant unterscheidet, d.h. daß $Z_K^{P_K} > Z_V^{P_V}$ ist.

In der nun folgenden Tabelle 3 (Seite 28) stellen wir die Ergebnisse der Signifikanzberechnungen dar. Dabei sind in den äußersten Spalten rechts und links die Kulturarten und die Kulturtage aufgeführt, die jeweils miteinander rechnerisch verglichen werden. In den dazwischen liegenden Spalten stehen die Ergebnisse jeweils für den 1. Tag, eine Woche und zwei Wochen post injectionem.

	1 TAG P.i. - [i]	1 WOCHE P.i. - [ii]	2 WOCHEN P.i. - [iii]	
HOMOLOGE PATIENTENKULTUREN UNTER VLB [Zv Pv] 3. KULTURTAG	$\chi^2_6 = 152,396$ P < 0,01	$\chi^2_5 = 11,207$ 0,05 > P < 0,02	$\chi^2_7 = 86,790$ P < 0,01	HOMOLOGE NORMALKULTUREN [Zk Pk] 3. KULTURTAG
5. KULTURTAG	$\chi^2_2 = 241,067$ P < 0,01	$\chi^2_5 = 47,190$ P < 0,01	$\chi^2_7 = 25,212$ P < 0,01	5. KULTURTAG
HOMOLOGE PATIENTENKULTUREN UNTER VLB [Zv Pv] 3. KULTURTAG	$\chi^2_6 = 28,512$ P < 0,01	$\chi^2_6 = 76,881$ P < 0,01	$\chi^2_6 = 4,540$ P > 0,01	HOMOLOGE PATIENTENKULTUREN VOR VLB [Zo Po] 3. KULTURTAG
5. KULTURTAG	$\chi^2_6 = 97,906$ P < 0,01	$\chi^2_6 = 45,981$ P < 0,01	$\chi^2_6 = 44,003$ P < 0,01	5. KULTURTAG
HOMOLOGE PATIENTENKULTUREN UNTER VLB [Zv Pv] 3. KULTURTAG	$\chi^2_6 = 99,052$ P < 0,01	$\chi^2_3 = 42,106$ P < 0,01	$\chi^2_7 = 14,500$ P > 0,01	HETEROLOGE PATIENTENKULTUREN [Zv Pk] 3. KULTURTAG
5. KULTURTAG	$\chi^2_6 = 207,053$ P < 0,01	$\chi^2_5 = 16,455$ P < 0,01	$\chi^2_7 = 3,399$ P > 0,01	5. KULTURTAG
HOMOLOGE NORMALKULTUREN [Zk Pk] 3. KULTURTAG	$\chi^2_6 = 110,518$ P < 0,01	$\chi^2_5 = 48,381$ P < 0,01	$\chi^2_7 = 11,563$ P > 0,01	HETEROLOGE NORMALKULTUREN [Zk Pv] 3. KULTURTAG
5. KULTURTAG	$\chi^2_6 = 264,104$ P < 0,01	$\chi^2_5 = 213,389$ P < 0,01	$\chi^2_7 = 77,438$ P < 0,01	5. KULTURTAG

TABELLE 3: ERGEBNISSE DER SIGNIFIKANZBERECHNUNGEN

In der Tabelle 4 sind zur Verschaffung eines schnellen Überblickes noch einmal die Ergebnisse der Signifikanzberechnungen durch die Zeichen $<$, $>$ und $=$ dargestellt.

	1 Tag p.i.	1 Woche p.i.	2 Wochen p.i.	
<u>$Z_{V^P V}$</u>				<u>$Z_{K^P K}$</u>
3. Tag	$<$	$=$	$<$	3. Tag
5. Tag	$<$	$<$	$<$	5. Tag
<u>$Z_{V^P V}$</u>				<u>$Z_{O^P O}$</u>
3. Tag	$<$	$>$	$=$	3. Tag
5. Tag	$<$	$>$	$>$	5. Tag
<u>$Z_{V^P V}$</u>				<u>$Z_{V^P K}$</u>
3. Tag	$<$	$>$	$=$	3. Tag
5. Tag	$<$	$>$	$=$	5. Tag
<u>$Z_{K^P K}$</u>				<u>$Z_{K^P V}$</u>
3. Tag	$>$	$>$	$=$	3. Tag
5. Tag	$>$	$>$	$>$	5. Tag

Tabelle 4

Ergebnisse der Signifikanzberechnungen in Kurzform

Es bedeuten:

- $<$ = Blastenzahlen der links stehenden Kulturart signifikant niedriger als die der rechts stehenden
- $>$ = Blastenzahlen der links stehenden Kulturart signifikant höher als die der rechts stehenden
- $=$ = zwischen den Blastenzahlen der links und rechts stehenden Kulturart bestehen keine signifikanten Unterschiede

(Die weitere Einteilung der Tabelle 4 stimmt mit der Einteilung der Tabelle 3 auf Seite 28 überein).

4. Mitosebefunde

Bei der Gesamtzahl der gezählten Zellen wurden 97 Mitosen gefunden.

Wegen dieser geringen Zahl wird auf eine statistische Auswertung verzichtet.

Aus Tabelle 5 ersieht man die Verteilung der Mitosephasen aufgeschlüsselt nach Velbe^R-Injektionstermin und Kulturart (s. Seite 31).

In der Abbildung V (Seite 32) ist nun die prozentuale Verteilung auf die gefundenen Mitosen aufgetragen. Zusammengefaßt sind in Kurve 1: $Z_V^{P_V}$, $Z_V^{P_K}$ und $Z_K^{P_V}$ und in Kurve 2: $Z_K^{P_K}$ und $Z_O^{P_O}$.

Addiert man die Prozentzahlen der Metaphasen der Kulturen unter Velbe^R- bzw. ohne Velbe^R-Einfluß, so zeigt sich bei Werten von 43,4 % bzw. 51,0 % ein Überwiegen der Metaphasen in den Kontrollkulturen, während unter Velbe^R-Einfluß die Prophasen von 30,4 % auf 40,0 % vermehrt sind.

		Pro- phase	frühe Metaph.	späte Metaph.	Ana- phase	Telo- phase	Rekon- str.-Ph.
$Z_V^{P_V}$	I	1	1	0	0	1	0
	II	3	2	0	0	1	0
	III	5	5	2	2	0	0
$Z_V^{P_K}$	I	0	1	0	0	0	0
	II	4	3	1	0	0	0
	III	8	2	2	0	0	0
$Z_K^{P_K}$		9	14	3	1	0	0
$Z_K^{P_V}$	I	2	1	1	1	1	1
	II	1	2	2	0	0	1
	III	3	0	2	0	0	0
$Z_O^{P_O}$		3	1	3	0	1	0
Σ		39	32	16	4	4	2

Tabelle 5

Es bedeuten:

- I : Mitosen 1 Tag nach Velbe^R-Injektion
 II : Mitosen 1 Woche nach Velbe^R-Injektion
 III : Mitosen 2 Wochen nach Velbe^R-Injektion
 (weitere Abkürzungen siehe Seite 16)

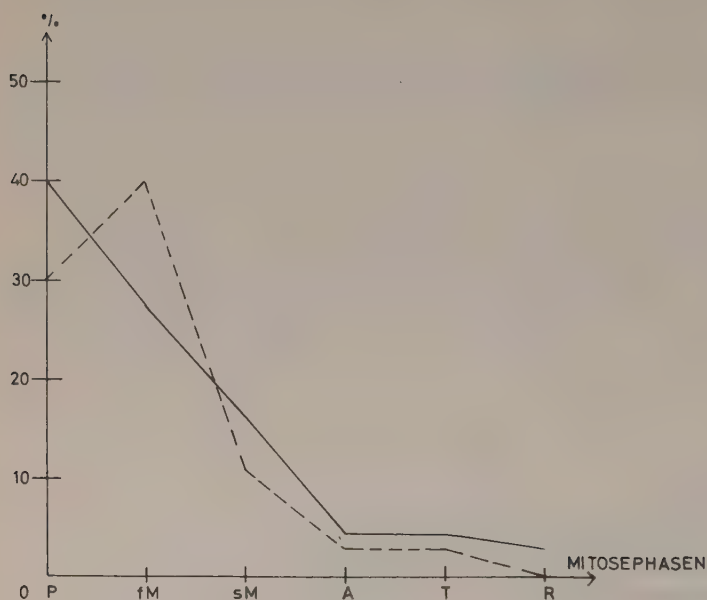


ABBILDUNG V.2 PROZENTUALE VERTEILUNG DER MITOSEPHASEN AUF

- 1.) 62 MITOSEN UNTER VLB EINFLUSS [—————]
- 2.) 35 MITOSEN OHNE VLB EINFLUSS [- - - - -]

P - PROPHASE

A - ANAPHASE

fM - FRÜHE METAPHASE

T - TELOPHASE

sM - SPÄTE METAPHASE

R - REKONSTRUKTIONSPHASE

5. Zusammenfassung der Ergebnisse

Aus fast allen Kurvenverläufen (Abb. I a - IV) ist zu erkennen, daß am 7. Kulturtag die Immunoblasten-Prozentzahlen niedriger sind.

Die durchschnittliche Blastentransformationsrate der homologen Normalkulturen erreicht am 3. und 5. Tag in allen Fällen die höchsten Werte (Abb. I a - IV).

Die Zellen der Normalpersonen im heterologen VLB-Plasma ($Z_{K^P_V}$) zeigen im Vergleich zum autologen Plasma ($Z_{K^P_K}$) eine geringere Transformierbarkeit. Dies ist signifikant, mit Ausnahme des 3. Tages 2 Wochen p.i. (Tabelle 4).

Die Kulturen der Patienten-Lymphocyten vor VLB-Behandlung ($Z_{O^P_O}$) sind, wie die Abbildungen I a - III a zeigen, deutlich geringer stimulierbar als die des Normalkollektivs.

Die Patientenkulturen unter VLB-Behandlung zeigen einen Tag nach Velbe^R-Injektion (Abb. I a) eine signifikant niedrigere Transformationsrate als die Kontrollkulturen sowohl des Normalkollektivs ($Z_{K^P_K}$) als auch des Patientenkollektivs ($Z_{O^P_O}$) vor VLB-Behandlung (Tabelle 4). Eine bzw. zwei Wochen p.i. (Abb. II a u. III a) liegen die Immunoblasten-Prozentzahlen unter denen des Normalkollektivs. Dies ist am 5. Tag 1 Woche p.i. und am 3. und 5. Tag 2 Wochen p.i. auch statistisch signifikant (Tabelle 4). Andererseits aber übertreffen die Blasten-Prozentzahlen 1 bzw. 2 Wochen nach Velbe^R-Therapie die Blasten-Prozentzahlen vor der Behandlung mit diesem Medikament (Abb. IV a). Auch dieses Ergebnis ist bis auf den 3. Tag 2 Wochen p.i. statistisch signifikant (Tabelle 4).

Die Patientenzellen 1 Tag p.i. werden durch Phytohaemagglutinin in heterologem Plasma ($Z_{V^P_K}$) signifikant besser stimuliert als in homologem Plasma ($Z_{V^P_V}$) (siehe Abb. I a

und Tabelle 4). Eine Woche p.i. (Abb. I a und Tabelle 4) wachsen in der homologen Kultur ($Z_V^{P_V}$) signifikant mehr Blasten, während 2 Wochen p.i. (Abb. III a) sowohl am 3. als auch am 5. Kulturtag sich keine signifikanten Differenzen ergeben.

Mitosen werden insgesamt nur sehr wenige gefunden. Eine Häufung von Metaphasen in den unter Velbe^R-Einfluß stehenden Kulturen ist nicht zu erkennen.

V. DISKUSSION

Im ersten Punkt der Fragestellung auf Seite 6 wird die Frage aufgeworfen, ob sich die Blastentransformierungsrate der mit VLB-Behandelten ($0,07 - 0,2 \text{ mg Velbe}^R/\text{kg KG}$) im Vergleich zu den Kontrollkulturen ändert. Diese Frage kann bejaht werden.

Es läßt sich herausarbeiten, daß es einen Tag post injectionem zu einer ausgesprochenen Depression der homologen Z_{VPV} -Kulturen kommt. Die Blasteninhibition ist signifikant sowohl zu einer Normalgruppe als auch zur Patientengruppe vor Behandlung mit Vincaleukoblastin. Dieses Ergebnis stimmt überein mit dem von ASTALDI (3), der 48 Stunden nach einer viel höheren Dosis (20 mg Velbe^R) ebenfalls eine starke Depression der Blastenbildung beobachtet.

HAN (29) findet auch eine Inhibierung der Blastenbildung durch VLB, macht aber keine Angaben in seiner Arbeit, welcher zeitliche Abstand zwischen VLB-Injektion und Kultivierung der Blutzellen besteht. Das gleiche gilt für die Untersuchungen von SCHEURLLEN (53), der weder eine Ab- noch eine Zunahme der Blastenbildung unter VLB herausarbeiten kann.

Es wird somit deutlich, daß vor Ausscheidung von VLB aus dem Organismus die Lymphocytenanttransformation in vitro stark gehemmt wird, wobei man für die Inaktivierung und Elimination dieses Stoffes nach FUSENING (12), VAINUTIS (60) und VALERIOTE (62) etwa 48 - 72 Stunden annehmen muß. Später jedoch - eine bzw. zwei Wochen p.i. - kommt es zu einer wesentlichen Verbesserung der Transformierbarkeit, denn, wie die Abbildung IV zeigt, liegen die Blasten-Prozentzahlen der mit VLB Behandelten zu diesen Zeitpunkten deutlich über denen vor der Therapie. Die Ursache der niedrigen Blastenwerte vor Einsetzen der VLB-Therapie liegt hauptsächlich in

den Grundleiden. So finden HERSH (33), SCHEURLEN (54), QUAGLINO (52), PAPPAS (49) und BRITTINGER (14) bei der Lymphogranulomatose, dem Lymphosarkom und dem Retothelsarkom schon ohne Cytostatikaeinfluß eine Verminderung der Blastenbildung. Von unseren Patienten waren 3 an M. Hodgkin, 3 an Lymphosarkom und 1 an einem Retothelsarkom erkrankt.

Zu bedenken aber ist auch andererseits, wie in Tabelle 1 aufgezeigt, daß alle Patienten vor der VLB-Behandlung mit Cyclophosphamid und - bis auf 2 - auch mit Röntgen- bzw. Hochvolt-Therapie behandelt worden sind. Über die stark depressive Wirkung des Cyclophosphamids auf die Blastenbildung berichten ASTALDI (3) und HERSH (34). Noch bedeutender scheint die Strahlenbehandlung zu sein. AMBS (1) berichtet über Phytozellen-Depression nach Röntgen-Therapie, und HAN (29) beschreibt die Strahlen-Therapie als ein beständiges Mittel zur Blastendepression. Möglicherweise gehen die niedrigen Blasten-Prozentzahlen vor dem Therapiebeginn mit VLB zusätzlich auch auf diese Vorbehandlungen zurück.

Die zweite Frage, die wir uns anfangs gestellt haben, nämlich ob die Patienten-Lymphocyten im heterologen Plasma (Z_{VP_K}) stärker auf die Stimulierung von Phytohaemagglutinin reagieren als im homologen, kann 1 Tag post injectionem beantwortet werden (Abbildung I a).

Dieses Ergebnis ist zu erwarten, da sich in den homologen Patientenkulturen (Z_{VP_V}) noch zu der in-vivo-Einwirkung des Velbe^R der Einfluß des mit dem Plasma in vitro zugesetzten Medikamentenrestes addiert.

Eine Woche post injectionem jedoch wachsen die Patientenzellen im heterologen Plasma (Z_{VP_K}) signifikant schlechter als im homologen Plasma (Z_{VP_V}) (Abbildung II a).

Zwei Wochen post injectionem (Abbildung III a) zeigt sich dann wieder ein besseres Wachstum der Patientenzellen im

Kontrollplasma (Z_{VP_K}), ein Unterschied, der jedoch nicht statistisch signifikant ist. Da sich, wie man annehmen muß, eine bzw. zwei Wochen nach Injektion kein VLB mehr in den homologen Kulturen befindet, müßte zu diesen Zeitpunkten eine bessere oder gleiche Transformationsrate in den heterologen wie in den homologen Patientenkulturen erwartet werden. Eine schlechtere Transformation, wie wir sie 7 Tage p.i. finden, können wir nicht erklären. Zu einem ähnlich unerwarteten Ergebnis kommt auch PAPPAS (48), der von 24 M. Hodgkin-Fällen berichtet, bei denen 8 Kulturen von M. Hodgkin-Lymphocyten mit Normalplasma eine geringere Transformation zeigen als die autologen Patientenkulturen.

Im 3. Punkt der Fragestellung wird die Frage aufgeworfen, ob die Lymphocyten der Normalpersonen im Plasma der VLB-Behandelten schwächer auf die Stimulierung reagieren.

Die Lymphocyten der Normalpersonen zeigen in allen Fällen im heterologen Plasma eine schlechtere Transformierbarkeit als im homologen Plasma (Abbildung I a - III a). Dies ist bis auf den 3. Kulturtag zwei Wochen p.i. auch statistisch signifikant nachzuweisen. Es muß also angenommen werden, daß vom Plasma der Patienten ein die Transformierung hemmender Einfluß ausgeht. Einen Tag p.i. dürfte der sich noch im Plasma befindende VLB-Rest den Hauptteil dieser Inhibition bewirken. Für die verminderten Blastenzahlen zu den späteren Zeitpunkten müssen andere Ursachen verantwortlich sein.

In der Literatur finden sich über VLB-behandelte Patienten zu der Problematik der Kreuzkulturen keine Hinweisé, wohl aber wieder bei den Arbeiten über maligne Erkrankungen des lymphoretikulären Systems. In den Arbeiten von TRUBOWITZ (59) und PAPPAS (48) wird dem Plasma von lymphoretikulären Systemerkrankungen an sich schon ein depressiver Effekt auf die Lymphocyten-Transformation zugeschrieben. Beide Autoren haben Zellen und Plasma von Patienten und gesunden Kontroll-

personen in gleicher Weise wie wir gekreuzt und finden eine deutliche Depression der Blastentransformation in den Kulturen, die das Patientenplasma enthalten.

PAPPAS (50) findet bei unbehandelten Patienten mit malignen, nicht lymphoretikulären Erkrankungen, daß das Plasma von Carcinom-Kranken normale Lymphocyten stärker an der Transformation hindert als normales Plasma Lymphocyten von Carcinom-Kranken. Er vermutet bei Carcinomen wie bei der Lymphogranulomatose einen plasmatischen Hemmfaktor. Über die Natur dieses Hemmfaktors besteht bisher Unklarheit.

Zu ähnlichen Ergebnissen kommen die Untersucher der L-Asparaginase, die ebenfalls einen depressiven Effekt auf die Lymphocytentransformation ausübt. So berichten OHNO (46), BISCATTI (10) und ASTALDI (4), daß das Plasma von L-Asparaginase-Behandelten die Lymphocyten von Gesunden bei der Blastentransformation hemmt. Hier jedoch wäre auch eine direkte Medikamenteneinwirkung möglich, da nach BARBIERI (6) die Serumhalbwertszeit von L-Asparaginase zwar nur 27,5 Stunden beträgt, L-Asparaginase aber bis zur vollständigen Elimination noch 15 Tage im Serum nachweisbar ist.

Punkt 4 unserer Fragestellung betrifft das Problem der Metaphasenvermehrung unter VLB.

Übereinstimmung herrscht in der Literatur darüber, daß es unter Einwirkung von VLB in vivo und in vitro zur Arretierung der Mitosevorgänge in der Metaphase kommt (LETTRE (40), FUSENING (22), VAITKEVICIUS (61), VAINUTIS (60)), und der antitumoröse Effekt im allgemeinen wird auf die Metaphasenarretierung zurückgeführt. In der vorliegenden Untersuchung wurde nun einerseits eine deutlich depressive Auswirkung auf die Blastenbildung beobachtet, andererseits aber eine relativ geringe Zahl von Mitosen überhaupt gezählt.

HERSH (33) gibt bei gesunden Kontrollpersonen in der Phytohaemagglutinininkultur einen Mitoseindex (Mitosezahl pro 100 teilungsfähige Zellen) von 1,5 % und NOWELL (45) von 0,5 - 1,0 % an.

Berechnen wir den Mitoseindex unserer gezählten Blasten, so kommen wir bei den unter VLB-Einfluß stehenden Kulturen auf 0,3 %, bei den nicht unter VLB-Einfluß stehenden auf 0,24 %.

Da wir also eine Vermehrung der Metaphasen nach VLB-Therapie nicht beobachtet haben (Tabelle 5), widersprechen unsere Ergebnisse der geltenden Meinung. Bei der signifikanten Verminderung der Blastenbildung einen Tag nach VLB-Injektion, die wir auf VLB-Einfluß zurückführen, wäre zumindest am 3. Kulturtag eine starke Vermehrung der Metaphasen zu erwarten; denn nach ELVES (19) findet man nach einer Kultivierungszeit von 72 Stunden ein Maximum an Mitosen. Am 5. und 7. Kulturtag wäre dann eine Blastenverminderung durch Degeneration der vorher in der Metaphase arretierten Blasten denkbar. Wir finden aber bereits nach 72 Kulturstunden die Immunoblasten-Inhibition (Abbildung I a).

Die Klärung dieses Widerspruches leitet zur Beantwortung unserer 5. Fragestellung über, nämlich ob sich Beziehungen zum Wirkungsmechanismus der Vincaalkaloide herstellen lassen.

Nach den Kenntnissen über den physiologisch-chemischen Wirkungsmechanismus von VLB müssen folgende Tatsachen beachtet werden:

VLB wie auch Vincristin üben ihre Wirkung in der Metaphase aus (FUSENING (22), GEORGE (25), GEBHARDT (24), CUTTS cit. nach FUSENING (22)).

Der Blut-Aktivitätsspiegel von VLB und Vincristin steigt in den ersten Stunden steil an, um dann rasch abzusinken (FUSENING (22), VALERIOTE (62)). Im Tierversuch sind nach

24 Stunden nur noch 1,6 % des Blut-Aktivitätsspiegels vorhanden (BEER (7)). Eine niedrige Plasmakonzentration bei langer Einwirkzeit - ein Zustand, wie ihn BEER (7) durch intraperitoneale Injektion erreicht - zeigt noch deutlichere VLB-Wirkungen. Niedrige Konzentrationen bei längerer Wirkzeit finden sich auch in unseren Kulturen 1 Tag p.i.

Beim Menschen erreichen die Vincaalkaloide ihre maximale Wirkung etwa nach 6 - 24 Stunden, denn VAINUTIS (60) findet in dieser Zeit nach intraperitonealer Injektion keine Postmetaphasen mehr in den Tumorzellen des Ascites. Das Maximum an Metaphasen hielt allerdings bis zur 96. Stunde nach der VLB-Injektion an. VAITKEVITJUS (61) berichtet von Metaphasenarretierung in malignen Exsudatzellen und Tumorbiopsien nach 18 Stunden.

ASTALDI (3) macht keine Angaben über eine beobachtete Metaphasenarretierung. So ist anzunehmen, daß in seinen Untersuchungen - ähnlich wie in den unserigen - keine Häufung von Metaphasen auffällig ist. Dennoch findet er zwei Tage post injectionem auch eine Blastendepression in den Lymphocytenkulturen.

Es müssen also neben dem antimitotischen Effekt noch weitere Möglichkeiten der VLB-Einwirkung auf Zellen angenommen werden, die die gefundene Blastendepression 24 Stunden p.i. erklären. Dafür sprechen auch die Untersuchungen von KRAHE (37), der bei Lebendbeobachtungen eine vernichtende Wirkung an Ovarial-Carcinom-Asciteszellen nach VLB-Zugabe nachweist, obwohl sich diese zum größten Teil nicht in Mitose befinden. Weiterhin berichtet LIMBURG (41) von Untersuchungen bei Resistenzprüfung an Carcinom-Gewebe in vivo, bei denen er ausgeprägte cytotoxische Degeneration, jedoch keine Metaphasenhemmung nachweisen kann.

Ferner muß der besonders beim Vincristin ausgeprägte neurotoxische Nebeneffekt auf andere Wirkungsmechanismen

zurückgeführt werden, da Nervenzellen normalerweise keine Teilungen mehr durchführen.

GEORGE (25) vermutet, Vincristin und Vincaläuboblastin wirken therapeutisch mit einem Mechanismus, der nicht unbedingt mit dem antimitotischen Effekt korreliert. Er begründet seine Ansicht damit, daß sich zwar Vincristin, Vincaläuboblastin und auch Colchicin in der Metaphasenarretierung gleichen, aber, wenn eines der Medikamente therapeutisch keinen Erfolg mehr bietet, mit den anderen durchaus noch gute Therapieerfolge erzielt werden können.

Nach unseren Ergebnissen ist anzunehmen, daß VLB nicht nur als Spindelgift wirkt, sondern auch den Zellstoffwechsel schädigt, der die Umwandlung der Lymphocyten unter Phytohaemagglutinin in Immunoblasten bewirkt.

Nach den neueren Untersuchungen von MALAWISTA (42) beeinflußt VLB den Stoffwechsel, indem es jenes Protein im Cytoplasma bindet, welches zur Ausbildung der Mikrotubuli von der Zelle benötigt wird. Nach den Ergebnissen von HALPERN und ROBINEAUX (28) scheint es möglich, daß solche Mikrotubuli bereits in den nicht transformierten Zellen vorkommen. Somit ist denkbar, daß vor Beginn der Mitose an den noch nicht transformierten Zellen das für die Ausbildung der Mikrotubuli benötigte Protein durch VLB gebunden und damit eine Umwandlung in Blasten verhindert wird.

Einen Tag nach Velber^R-Injektion mußte VLB für die mangelnde Blastentransformation verantwortlich sein. Denn zu diesem Zeitpunkt ist das Medikament noch nicht aus dem Organismus eliminiert und geht mit dem Plasma in den Kulturansatz über.

Eine und zwei Wochen post injectionem ist mit größter Wahrscheinlichkeit VLB vollständig eliminiert und kann nicht mehr in die Kulturen eingehen. Zu diesen späteren Zeitpunkten hat sich offensichtlich die Transformierbarkeit der Lymphocyten bei den untersuchten Patienten gegenüber den

Ausgangswerten vor VLB-Therapie gebessert. Eine Blastendepression bleibt allerdings weiterhin nachweisbar, da die Blastenzahlen der Normalkulturen nicht erreicht werden. Die sichtbar vermehrte Transformationsrate aber bedeutet eine Verbesserung der Immunkompetenz des Organismus und somit einen günstigen therapeutischen Effekt.

Dieses Ergebnis korreliert mit dem klinischen Erfolg bei unseren Patienten. Bei den 7 Erkrankten sahen wir in 4 Fällen einen guten, in 2 Fällen einen mäßigen und bei 1 Patientin keinen Erfolg durch die VLB-Behandlung.

Wie läßt sich die Verbesserung der Transformation erklären?

GROPP (27) beschreibt in seinen Untersuchungen über die Lymphocyten-Transformation in vitro bei chronisch lymphatischer Leukaemie (CLL) zwei Arten von Zellen im peripheren Blut: suffiziente, zur immunocytologischen Reaktion befähigte, und insuffiziente, zu dieser Reaktion nicht befähigte Lymphocyten.

HEINE (32) findet nach cytostatischer Behandlung oder Röntgenbestrahlung der Milz bei CLL eine Senkung der Lymphocytenzahl im Blut, vorwiegend auf Kosten der nicht stimulierbaren Lymphocyten, und damit eine relative Vermehrung der funktionstüchtigen mit Anstieg der Transformationsrate.

Von zwei verschiedenen Lymphocyten-Populationen in diesem Sinne berichtet ebenfalls ASTALDI (2).

Ein ähnlicher Vorgang wäre auch bei anderen Erkrankungen des lymphoretikulären Systems denkbar: Die direkte Gegenwart des Cytostatikums schädigt global die gesamte Lymphocytenfraktion. Bei erfolgreicher Therapie jedoch wird vorwiegend die pathologische Zellform zurückgedrängt, was zu einer Zunahme der funktionstüchtigen Lymphocyten und damit zur Erhöhung der Immunoblastenbildung führt.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Von 7 Patienten mit lymphoretikulären Erkrankungen und Kontrollpersonen wurden mit Phytohaemagglutinin stimulierte Lymphocyten-Kreuzkulturen angelegt und der Einfluß von in vivo gegebenem Velbe^R auf die Transformationsrate untersucht.

Dabei fanden wir:

1. Die Stimulierbarkeit der Patienten-Lymphocyten ist signifikant niedriger als die der gesunden Kontrollpersonen.
2. 1 Tag post VLB-injectionem wird die Blastentransformation gesunder wie pathologischer Lymphocyten signifikant gesenkt.
3. Die Patienten-Lymphocyten sind 7 - 14 Tage nach VLB-Injektion deutlich besser stimulierbar als vor der Behandlung. Dieser Effekt wird auf die Elimination der pathologischen Lymphocytenfraktion zurückgeführt.
4. Das Patientenplasma unter VLB-Einfluß übt einen deutlichen inhibitorischen Effekt auf die Blastenbildung Gesunder aus.
Die Ursache muß einen Tag post injectionem auf VLB-Einfluß, 7 - 14 Tage p.i. jedoch auf einen Hemmfaktor im Plasma der an lymphoretikulären Erkrankungen Erkrankten zurückgeführt werden.
5. Die Stimulierbarkeit der Patienten-Lymphocyten im Plasma Gesunder verhält sich uneinheitlich; während sich 1 und 14 Tage p.i. die Blastenbildung verbessert, ist die Transformationsrate 7 Tage p.i. verschlechtert.
6. Eine Häufung von Metaphasen unter VLB wird nicht beobachtet.

tet, weshalb die deprimierende Wirkung des Vincaleukoblastins auf die Blastentransformation auf einen anderen Wirkungsmechanismus zurückzuführen ist.

VII. L I T E R A T U R

1. Ambs, E.: Die Lymphocytenkultur und ihre Beziehung zu klinischen Problemen.
Klin. Wschr. 47: 789 (1969)
2. Astaldi, G.: Das Phytohaemagglutinin und das Problem der Lymphocyten.
Med. Klin. 59: 368 (1964)
3. Astaldi, G., S. Eridani, G.B. Ponti, R. Valentini, A. Giangrande: Influence of antiblastic agents applied either in vivo or in vitro on human lymphocyte transformation in cell culture.
Blut XIX: 8 (1969)
4. Astaldi, G., D. Micu, G.R. Burgio, A. Astaldi, jr.: With reference to the immunosuppressive effect of E. coli L-asparaginase. S. 69
13. Int. Haemat. Congr., München 1970
5. Astaldi, G., D. Micu, A. Astaldi, jr., G.R. Burgio: Immunological effect of E. coli L-asparaginase.
Blut XXI: 273 (1970)
6. Barbieri, A. et al.: Relationship between L-asparaginase blood level and inhibition of lymphocyte blastogenesis.
Boll. Ist. sieroter. milan. 49: 5 (1970)
7. Beer, C.T., J.F. Richards: The metabolism of vinca alkaloids. II. The fate of tritiated vinblastine in rats.
Lloydia 27: 352 (1964)
8. Belitz, H.J.: Die Anwendung statistischer Methoden in der Biologie.
Mathematikunterricht 3: 83 (1960)
9. Bernengo, M.G., G. Benzio, L. Casiano, L. Pegoraro: Attiva della deossicitidilato-deaminasi mi linfociti umani stimolati con fitoemagglutinina.
Boll. Soc. ital. Biol. sper. 46: 163 (1970)

10. Biscatti, G., A. Astaldi, L. Ferfaglia, G.R. Burgio,
G. Astaldi: With reference to the lymphocyte
suppressive effect of *E. coli* L-asparaginase.
Boll. Ist. sieroter. milan. 48: 5 (1969)
11. Bleeher, N.M., A.M. Jeliffe: Vinblastine sulphate in
the treatment of malignant disease.
Brit. J. Cancer XIX: 268 (1965)
12. Boll, I.: Morphologische Studien zum Verhalten von
Knochenmarkzellen in vitro. I. Granuloblasten-
mitosen.
Folia haemat. 3: 78 (1958)
13. Bouroncle, B.A., K.P. Clausen, J.F. Aschenbrand:
Studies of the delayed response of phytohemag-
glutinin (PHA) stimulated lymphocytes in 25
chronic lymphatic leukemia patients before and
during therapy.
Blood 34: 166 (1969)
14. Brittinger, G., E. König, G. Cohnen, H.G. Aberle:
Lysomale Enzyme in Blutlymphocyten bei chroni-
scher lymphatischer Leukaemie (CLL) und anderen
lymphoretikulären Erkrankungen vor und nach Stimu-
lierung mit PHA in vitro.
II. Arb.-Tagg. f. Leukocytenkulturen, Essen-Kett-
wig 1970
15. Cutts, J.H., C.T. Beer, R.L. Noble: Effects on hemato-
poiesis in rats of extracts of *Vinca rosea*.
Rev. canad. Biol. 16: 476 (1957)
16. Dau, P.C., R.D.A. Peterson: Transformation of lympho-
cyte from patients with multiple sclerosis. Use
of an encephalitogen of human origin with a re-
port of a trial of immunosuppressive therapy in
multiple sclerosis.
Arch. Neurol. 23: 32 (1970)

17. Denman, E.J., A.M. Denman, B.M. Greenwood, D. Gall:
Failure of cytotoxic drugs to suppress immune response of patients with rheumatoid arthritis.
Ann. rheum. Dis. 29: 220 (1970)
18. Elves, M.W.: The Lymphocytes.
(Lloyd-Luke, London 1966)
19. Elves, M.W.: The effects of phytohaemagglutinin on normal and leukaemic leukocytes when cultured in vitro.
Exp. Cell Res. 30: 200 (1963)
20. Farrow, M.G., K. van Duke, W.V. Morgantown: Microsystems for measurement of anti-nucleic acid, antileukemic-drug effects in developing human chromosomes.
Pharmacologist 12: 282 (1970)
21. Fusening, N.E., P. Obrecht: Die Wirkung des Cytostatikums Velbe auf den Kohlehydratstoffwechsel von Tumorzellen.
5. Int. Kongr. Chemotherapie, Wien 1967, Bd. II/2, S. 745
22. Fusening, N.E., P. Obrecht: Der Wirkungsmechanismus der Vinca-Alkaloide.
Int. Symp. ü.d. Anwendung d. Vinca-Alkaloide Velbe und Vincristin, S. 148
(Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien 1969)
23. Fusening, N.E.: Diskussionsbeitrag. in: Int. Symp. ü.d. Anwendung d. Vinca-Alkaloide Velbe und Vincristin, S. 158
(Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien 1969)
24. Gebhart, E., G. Schwanitz, G. Hartwich: Zytogenetische Wirkung von Vincristin auf menschliche Leukocyten in vivo und in vitro.
Med. Klin. 64: 2366 (1969)
25. George, P., L.J. Journey, Milton N. Goldstein:
Effect of vincristin on the fine structure of HeLa Cells during mitosis.
J. nat. Cancer Inst. 35: 355 (1965)

26. Goldsmith, M.H., J.I. Brody: Increased protein and gamma globulin synthesis by leukemic lymphocytes induced in vitro by low-dose 6-mercaptopurine. Clin. Res. 19: 471 (1970)
27. Gropp, A., F. Klee: Ergebnisse der Lymphocytenkultur in vitro bei Lymphadenosen. Verh. dtsh. Ges. Path. S. 503 (Fischer, Stuttgart 1969)
28. Halpern, B., Robineaux, R., R. Kourilski, A. Lépinay, M. Liacopoulos-Briot: Étude morphodynamique et ultrastructurale de la stimulation lymphocytaire par la phyto-hémagglutinine. Bull. Soc. Chim. biol. 50: 1059 (1968)
29. Han, T.: Lymphocyte response to phytohaemagglutinin in Hodgkin's disease. America 48: 728 (1970)
30. Heine, K.M., H. Stobbe: Lymphocytenstimulierung bei Morbus Hodgkin in der Zellkultur. Dtsch. Gesundheitsw. 23: 32 (1968)
31. Heine, K.M., H. Stobbe, R. Klatt, E. Apostoloff, W. Dutz: Lymphocyte transformation tests in patients under treatment with immunosuppressive drugs. Helv. med. Acta 35: 140 (1969)
32. Heine, K.M., H. Stobbe, E. Hofer, H. Weger: Lymphocyten-transformationstest bei chronischer lymphatischer Leukose unter Berücksichtigung der absoluten Lymphocytenzahl im Blut. Acta haemat. 41: 144 (1969)
33. Hersh, E.M., J.J. Oppenheim: Impaired in vitro lymphocyte transformation in Hodgkin's disease. New Engl. J. Med. 273: 1006 (1965)
34. Hersh, E.M., J.J. Oppenheim: Inhibition of in vitro lymphocyte transformation during chemotherapy in man. Cancer Res. 27: 98 (1967)

35. Hirschhorn, K., F. Bach, R.L. Kolodny, I.L. Firschein:
Immune response and mitosis of human peripheral
blood lymphocytes in vitro.
Science 142: 1185 (1963)
36. Kirchner, H., S. Bauer: Wirkung von L-Asparaginase aus
E. coli auf Phytohaemagglutinin-stimulierte Lym-
phocytenkulturen.
Klin. Wschr. 48: 50 (1970)
37. Krahe, M., S. Schulte-Overberg, I. Melzer: Zellstudien
mit Vinca-Alkaloiden in vivo und in vitro.
Int. Symp. ü.d. Anwendung d. Vinca-Alkaloide Velbe
und Vincristin. S. 170
(Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien 1969)
38. Krug, U., E. Ehrhardt: Die Wirkung von L-Asparaginase
auf PHA-stimulierte Lymphocytenkulturen.
II. Arb.-Tagg. f. Leukocytenkulturen, Essen-Kettwig
1970
39. Lettré, H.: Action of vincalcoblastine upon cells in
vitro and against Ehrlich ascites tumors; antitumo-
ral effects of vinca rosea alkaloids.
Int. Congr. Ser. 106:47 (1965)
40. Lettré, H.: Zellstudien mit Vinca-Alkaloiden in vivo und
in vitro.
Int. Symp. ü.d. Anwendung d. Vinca-Alkaloide Velbe
und Vincristin, S. 137
(Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien 1969)
41. Limburg, H., U. Heckmann: Über die Wirkung von Vinblastin-
sulfat auf menschliche Genitalkarzinome bei der Re-
sistenzprüfung in vitro und in vivo.
Int. Symp. ü.d. Anwendung d. Vinca-Alkaloide Velbe
und Vincristin, S. 162
(Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien 1969)
42. Malawista, S.E.: Vinblastine: Colchicine-like effects on
human blood leukocytes during phagocytosis.
Blood 37: 519 (1971)

43. Mathé, G. et al.: Valeur de la vincaléucoblastine dans le traitement de la maladie de Hodgkin et d'autres hématosarcomes et leucémies. Étude portant sur 100 malades.
Sem. Hop. Paris 40: 320 (1964)
44. Newall, J., J.F. Pringle: Vincaléucoblastine in Hodgkin's disease and other reticuloses.
Scot. med. J. 10: 288 (1965)
45. Nowell, P.C.: Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes.
Cancer Res. 20: 462 (1960)
46. Ohno, R.: Inhibition of lymphocyte blastogenesis by L-asparaginase (LA).
Proc. amer. Ass. Cancer Res. 10: 66 (1969)
47. Ohno, R. et al.: The inhibition of lymphocyte blastogenesis by L-asparaginase.
Blood 35: 250 (1970)
48. Pappas, A., P.G. Scheurlen: Untersuchungen über Einfluß von Plasma Hodgkin-Kranker auf die Phytohaemagglutinin-Transformation normaler Lymphocyten.
Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 74: 1254 (1968)
49. Pappas, A.: Lymphocytenkulturen in vivo mit der Diffusionskammer-Methode.
II. Arb.-Tagg. f. Leukocytenkulturen, Essen-Kettwig 1970
50. Pappas, A.: Vortrag auf der 77. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin.
Med. Tribune 22a: 30 (1971)
51. Pearson, K.: Wissenschaftliche Tabellen, S. 169
Geigy, Basel 1969)
52. Quaglini, D., D.C. Cowling: Cytochemical studies on cells from chronic lymphocytic leukaemia and lymphosarcoma cultured with phytohaemagglutinin.
Brit. J. Haemat. 10: 358 (1964)

53. Scheurlen, P.G.: Immunpathologie bei der Lymphogranulomatose.
Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 74: 747 (1968)
54. Scheurlen, P.G., A. Pappas, T. Ludwig: Stimulation der Blutlymphocyten durch Phytohaemagglutinin bei chronischer Lymphadenose, Lymphosarkomatose und Lymphogranulomatose.
Klin. Wschr. 46: 483 (1968)
55. Scheurlen, P.G.: Der Einfluß zytostatischer Maßnahmen auf die Lymphocytentransformation in vitro.
Fortschr. Krebsforsch. Bericht über die 10. wissenschaftl. Tagg. des Deutschen Zentrallausschusses für Krebsbekämpfung und Krebsforschung e.V., Berlin 1968, S. 423
56. Schubert, J., F. Walther, W. Mondorf, H. Martin: Vortrag auf der 77. Tagg. Dtsch. Ges. inn. Med.
Medical Tribune 22a: 36 (1971)
57. Siebs, W.: Zur Wirkung von Vincaleukoblastin auf normale und maligne Zellen in vitro.
Z. Zellforsch. 61: 231 (1963)
58. Svoboda, G.H.: The current status of research on the alkaloids of vinca rosea linn. Antitumoral effects of vinca rosea alkaloids.
Internat. Congr. Ser. 106: 14 (1965)
59. Trubowitz, S., B. Masek, A. Rosario: Lymphocyte response to phytohemagglutinin in Hodgkin's disease, lymphatic leukemia and lymphosarcoma.
Cancer 19: 2019 (1966)
60. Vainutis, K., M.D. Vaitkevicius: Vinca-Alkaloide in der Behandlung des Krebses.
Internat. Symp. ü.d. Anwendung d. Vinca-Alkaloide Velbe und Vincristin, S. 71
(Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien 1969)

61. Vaitkevicius, V.K., R.W. Talley, M.J. Brennan, J.L. Tucker: Cytological and clinical observations during vincleukoblastine therapy of disseminated cancer.
Cancer 15: 294 (1962)
62. Valeriote, F.A., W.R. Bruce: An in vitro assay for growth-inhibiting activity of vinblastine.
J. nat. Cancer Inst. 35: 851 (1965)
63. Wilmanns, W.: Diskussionsbeitrag.
Int. Symp. ü.d. Anwendung d. Vinca-Alkaloide
Velbe und Vincristin, S. 156
(Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien 1969)
64. Yoffey, J.M., G.C.B. Winter, D.G. Osmond, E.S. Meck: Morphological studies in the culture of human leukocytes with phytohaemagglutinin.
Brit. J. Haemat. 11: 488 (1965)

Am Ende dieser Arbeit möchte ich allen jenen danken,
die mir bei der Fertigstellung behilflich waren:

Frau Professor Dr. med. I. B o l l für die Anregung
zum gewählten Thema sowie für ihren weiteren fachkun-
digen Rat;

Herrn Professor Dr. H. J. B e l l i t z für die Anlei-
tung zur Signifikanzberechnung;

den Damen A. S c h l e i f f sowie I. S c h l a t -
t e r für Rat und Hilfe beim Herstellen der Kulturen.

Darüberhinaus gilt mein Dank dem ärztlichen Direktor
des Städtischen Krankenhauses Berlin-Neukölln, Herrn
Professor Dr. med. K. H o l l d a c k für die Arbeits-
möglichkeiten an seiner Klinik.

LEBENS LAUF

Name : Peter B o p p e l
Geburtstag : 24. Juni 1943
Geburtsort : Altlandsberg
Wohnort : Berlin - Wilmersdorf
Vater : Otto Boppel, gefallen 1944;
Diplom-Kaufmann
Mutter : Godelieve Zimmermann, geb. Evers
Stiefvater : Günther Zimmernann,
Beamter

- Ausbildung : 1) 15. Grundschule in Berlin-Charlotten-
burg
2) Neusprachlicher Zweig der Erich-Hoepner-
Schule in Berlin-Charlottenburg;
hier 1963 Abitur
3) Sommersemester 1963 Studium der Human-
medizin an der Universität Münster.
1963 bis 1969 Fortsetzung des Studiums
an der Freien Universität Berlin.
Februar 1969 Staatsexamen an der Freien
Universität Berlin, Gesamturteil:
sehr gut.
4) Juni bis September 1969 Medizinalassi-
stent an der chirurgischen Abteilung
des Städtischen Krankenhauses Wilmers-
dorf in Berlin.
Oktober 1969 bis März 1970 Medizinalassi-
stent an der I. Inneren Abteilung und
April bis Mai 1970 an der Anaesthesie-
Abteilung des Städtischen Krankenhauses
Neukölln in Berlin.

- 5) März 1970: Bestehen der Prüfung des Educational Council for Foreign Medical Graduates.
- 6) 11. Juni 1970: Erteilung der Approbation als Arzt in Berlin.
- 7) Seit 1. August 1970 als Assistenzarzt an der I. Medizinischen Klinik des Städtischen Krankenhauses Neukölln, Berlin, tätig.

